

09-22-03
Jmagp

6p/1634

Express Mail No. EV 313 841 775 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of: Sagner *et al.*

Confirmation No.: 7485

Serial No.: 09/823,712

Group Art Unit: 1634

Filing Date: March 30, 2001

Examiner: Arun K. Chakrabarti

For: *METHOD FOR DETERMINING THE
EFFICIENCY OF NUCLEIC ACID
AMPLIFICATIONS*

Attorney Docket No.: 1803-326-999

COMMUNICATION

COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. BOX 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Sir:

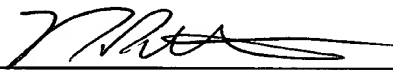
Applicants submit herewith certified copies of European Patent Application No. 00107036.6, filed March 31, 2000, and German Patent Application No. 10034209.4, filed July 13, 2000, and German Patent Application No. 10045521.1, filed September 13, 2000.

Applicant believes that no fees are due with these papers. However, if it is determined that a fee is due, please charge the required fee to Pennie & Edmonds LLP Deposit Account No. 16-1150 (order no. 1803-326-999).

Respectfully submitted,

Dated: September 19, 2003

For:


Rahul Pathak 42,983
(Reg. No.)
Nikolaos C. George (Reg. No. 39,201)
Pennie & Edmonds LLP
1155 Avenue of the Americas
New York, New York 10036
(212) 790-9090

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung



Aktenzeichen: 100 34 209.4

Anmeldetag: 13. Juli 2000

Anmelder/Inhaber: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Effizienz-korrigierten Echt-Zeit
Quantifizierung von Nukleinsäuren

Priorität: 31.3.2000 EP 00107036.6

IPC: C 12 Q 1/68



Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 30. November 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Titel: Verfahren zur Effizienz-korrigierten Echt-Zeit Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die vorliegende Erfindung stammt aus dem Gebiet der Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von quantitativer Echtzeit PCR.

Stand der Technik

Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren sind auf verschiedenen Gebieten der Molekularbiologie und insbesondere für die molekulare Diagnostik von Bedeutung. Auf DNA-Ebene werden derartige Verfahren beispielsweise zur Bestimmung von Kopienzahlen von im Genom amplifizierten Gensequenzen eingesetzt. Insbesondere finden Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren jedoch im Zusammenhang mit der Bestimmung von mRNA-Mengen Verwendung, weil diese in der Regel ein Maß für die Expression des jeweiligen codierenden Gens darstellen.

Bei in hinreichender Menge zur Verfügung stehendem Probenmaterial kann eine Quantifizierung spezieller mRNAs mit konventionellen Verfahren, wie Northern Blot-Analyse- oder RNAse-Protection-Assay-Verfahren durchgeführt werden. Diese Methoden sind jedoch bei nur in geringer Menge zur Verfügung stehendem Probenmaterial oder sehr schwach exprimierten Genen nicht sensitiv genug.

Eine wesentliche sensitivere Methode stellt allerdings die sogenannte RT-PCR dar. Bei diesem Verfahren wird ausgehend von der zu analysierenden mRNA zunächst eine einzelsträngige c-DNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase hergestellt. Anschließend wird mit Hilfe von PCR ein doppelsträngiges DNA-Amplifikationsprodukt erzeugt.

Dabei sind zwei verschiedene Varianten zu unterscheiden:

- Bei der sogenannten relativen Quantifizierung wird das Verhältnis der Expression einer bestimmten Target-RNA relativ zu der Menge an RNA eines sogenannten Housekeeping-Gens bestimmt, von dem angenommen wird, dass es in allen Zellen unabhängig vom jeweiligen physiologischen Status konstitutiv exprimiert wird. Somit liegt die mRNA in allen Zellen in

ungefähr gleicher Menge vor.

Dies hat den Vorteil, dass unterschiedliche Ausgangsqualitäten verschiedener Probenmaterialien und der Prozess der RNA-Präparation keinen Einfluss auf das bestimmte Ergebnis hat. Eine absolute Quantifizierung ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

- Alternativ dazu kann die absolute Menge an eingesetzter RNA mit Hilfe von Standardnukleinsäuren bekannter Kopienzahl und Amplifikation einer entsprechenden Verdünnungsreihe dieser Standardnukleinsäure bestimmt werden. Dabei sind zwei Alternativen möglich:

Bei der Verwendung von externen Standards erfolgt die Amplifikation von Standard- und Target-Nukleinsäure in getrennten Reaktionsgefäßen. Dabei kann ein Standard mit identischer Sequenz, wie die Target-Nukleinsäure verwendet werden. Bei dieser Art der Quantifizierung können jedoch systematische Fehler auftreten, falls die zu analysierende RNA-Präparation inhibitorische Komponenten enthält, die die Effizienz der sich anschließenden PCR-Reaktion beeinträchtigen. Derartige Fehler können durch die Verwendung von internen Standards, d. h. Amplifikation von Standard- und Target-Nukleinsäure in einem Reaktionsgefäß ausgeschlossen werden. Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass Standards verwendet werden müssen, die im Vergleich zur analysierten Target-Nukleinsäure unterschiedliche Sequenzen besitzen, um die Amplifikation von Standard- und Target-Nukleinsäure von einander unterscheiden zu können. Dies kann wiederum zu einem systematischen Fehler bei der Quantifizierung führen, da bei unterschiedlichen Sequenzen unterschiedliche Effizienzen der PCR-Amplifikation nicht ausgeschlossen werden können.

Eine Quantifizierung von PCR-Produkten kann auf zwei prinzipiell unterschiedliche Arten erfolgen:

- a) Endpunkt-Bestimmung der Menge an entstandenem PCR-Produkt in der Plateau-Phase der Amplifikationsreaktion.

Dabei korreliert die Menge an gebildetem PCR-Produkt nicht mit der Menge an initiiell eingesetzter Kopienzahl, weil die Amplifikation der Nukleinsäuren am Ende der Reaktion nicht mehr exponentiell erfolgt, sondern eine Sättigung erreicht. Demzufolge zeigen verschiedene initiale Kopienzahlen identische Mengen an entstandenem PCR-Produkt. Deshalb wird bei diesem Verfahren in der Regel die Methode der kompetitiven PCR bzw. der kompetitiven RT-PCR verwendet. Hierbei wird die spezifische Zielsequenz zusammen mit einer Verdünnungs-

reihe eines internen Standards bekannter Kopienzahl co-amplifiziert. Aus der Mischung mit identischer PCR-Produktmenge von Standard und Zielsequenz wird die initiale Kopienzahl der Zielsequenz extrapoliert. (Zimmermann et Mannhalter, BioTechniques 21:280 – 279, 1996). Nachteil dieser Methode ist auch hier die Messung im Sättigungsbereich der Amplifikationsreaktion.

b) Kinetische Echt-Zeit Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR.

Hierbei wird in jedem Zyklus der PCR die Entstehung von PCR-Produkten verfolgt. Die Messung der Amplifikation erfolgt dabei in der Regel in Thermozyklern, welche zusätzlich Mittel zur Messung von Fluoreszenzsignalen während der Amplifikationsreaktion aufweisen. Ein typisches Beispiel hierfür ist der Roche Diagnostics LightCycler (Cat. No. 2 011468). Die Amplifikationsprodukte werden beispielsweise durch Fluoreszenz-markierte Hybridisationsproben, die lediglich bei Bindung an die Target-Nukleinsäure Fluoreszenzsignale emittieren oder in bestimmten Fällen auch durch Doppelstrang-DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Ein definierter Signalschwellenwert wird für alle analysierten Reaktionen festgelegt und die zur Erreichung des Schwellenwerts notwendige Zykluszahl C_p sowohl für die Targetnukleinsäure als auch für die Referenznukleinsäuren wie Standard- bzw. Housekeeping-Gen bestimmt. Auf der Grundlage der für die Target-Nukleinsäure sowie die Referenz-Nukleinsäure erhaltenen C_p -Werte können auf diese Weise entweder absolute oder relative Kopienzahlen des Targetmoleküls bestimmt werden (Gibson et al., Genome Research 6: 995 – 1001, 1996; Bieche et al., Cancer Research 59:2759 – 2765, 1999; WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714).

Zusammengefasst erfolgt bei allen beschriebenen Verfahren die Quantifizierung einer Nukleinsäure über PCR immer mittels des Bezugs der während der Amplifikationsreaktion entstandenen Kopienzahl auf die entstandene Kopienzahl einer Referenznukleinsäure, bei der es sich entweder um einen Standard oder um die RNA eines Housekeeping Gens handelt. Dabei wird angenommen, dass sich die PCR-Effizienz von Ziel- und Referenznukleinsäure nicht unterscheiden.

Im Allgemeinen wird eine PCR-Effizienz von 2,00 angenommen, die einer Verdoppelung der Kopienzahl pro PCR-Zyklus entspricht (User Bulletin No. 2 ABI Prism 7700, PE Applied Biosystems, 1997)

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass eine reale PCR-Effizienz aber verschieden von 2,00 sein kann, da sie von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise Bindung der Primer, Länge des PCR-

Produktes, G/C-Gehalt und Sekundärstrukturen der zu amplifizierenden Nukleinsäure sowie von aufgrund der Probenvorbereitung im Reaktionsgemisch möglicherweise enthaltenen Inhibitoren beeinflusst wird. Dies betrifft insbesondere auch zu bei der Verwendung von heterologen Referenznukleinsäuren, wie z. B. bei der relativen Quantifizierung im Vergleich zur Expression von Housekeeping-Genen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war deshalb die Bereitstellung von Methoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, welche die genannten Nachteile des Stands der Technik überwindet. Insbesondere war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren bereitzustellen, bei denen die Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure unabhängig von den Amplifikationseffizienzen von Target-Nukleinsäure und Referenznukleinsäure erfolgt.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure unter definierten Bedingungen.
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure unter den gleichen Reaktionsbedingungen.
- c) Messung der Amplifikation in Echt-Zeit
- d) Quantifizierung der ursprünglichen Menge der Target-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten ursprünglichen Menge mit Hilfe der bestimmten Amplifikationseffizienz.

Erfindungsgemäß ist dieses Verfahren sowohl für relative Quantifizierung im Vergleich zur Expression von Housekeeping Genen als auch für absolute Quantifizierung einsetzbar.

Eine erster Aspekt der Erfindung bezieht sich deshalb auf ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur des aus Schritt c) abgeleiteten Verhältnisses mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten Kopienzahl mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

Bei allen Verfahren erfolgt die Bestimmung von Amplifikationseffizienzen vorzugsweise dadurch, dass

- a) eine Verdünnungsreihe der Nukleinsäure hergestellt wird
- b) eine Amplifikation der Nukleinsäure unter definierteren Reaktionsbedingungen gemäß A, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
- e) ausgehend von den bestimmten Zykluszahlen die Amplifikationseffizienz berechnet wird.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

- 5
- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure unter definierten Bedingungen.
 - b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure unter den gleichen Reaktionsbedingungen.
 - 10 c) Messung der Amplifikation in Echt-Zeit
 - d) Quantifizierung der ursprünglichen Menge der Target-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten ursprünglichen Menge mit Hilfe der bestimmten Amplifikationseffizienz.
- 15 Die Bedeutung einer Effizienzkorrektur wird durch eine Fehlerberechnung deutlich. In Tabelle 1 ist die theoretische Berechnung des durchschnittlichen prozentualen Fehlers der ermittelten Kopienzahl bei von 2,00 verschiedenen Amplifikationseffizienzen in Abhängigkeit von der jeweiligen Zykluszahl dargestellt. Die Fehlerberechnung erfolgte nach der Formel

20
$$\text{Prozentualer Fehler} = (2^n / E^n - 1) \times 100$$

wobei E die Effizienz der Amplifikation ist und n die jeweilige Zykluszahl ist, bei der der prozentuale Fehler bestimmt wird.

Tabelle 1:

Detektion Zyklus (n)	10	15	20	25	30	35
PCR Effizienz (E)						
2.00	-	-	-	-	-	-
1.97	16%	25%	35%	46%	57%	70%
1.95	29%	46%	66%	88%	113%	142%
1.90	67%	116%	179%	260%	365%	500%
1.80	187%	385%	722%	1290%	2260%	3900%
1.70	408%	1045%	2480%	5710%	13.000%	29.500%
1.60	920%	2740%	8570%	26.400%	80.700%	246.400%

Die Bestimmung der Amplifikationseffizienz kann durch verschiedene Verfahren, beispielsweise durch Ermittlung einer Funktion bestimmt werden, bei der das gemessene Signal hinsichtlich der Amplifikation der Target-Nukleinsäure in Abhängigkeit von der Zykluszeit bestimmt wird.

- 5 Vorzugsweise wird die Amplifikationseffizienz bestimmt durch ein Verfahren, bei dem
- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
 - b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
 - 10 c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
 - d) für jede Verdünnung die Zykluszahl C_p bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird
 - e) Eine logarithmisch lineare Funktion der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure in Abhängigkeit von der Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert überschritten wird, erstellt wird, und
 - 15 f) Die Amplifikationseffizienz E berechnet wird nach

$$E = G^{-a}$$

- 20 wobei a ermittelt wird als erste Ableitung der in Schritt e) ermittelten Funktion und G die Grundzahl des Logarithmus ist.

In ähnlicher Weise kann die Amplifikationseffizienz auch durch ein Verfahren bestimmt werden, bei dem

- 25
- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
 - b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
 - c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
 - 30 d) für jede Verdünnung die Zykluszahl C_p bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
 - e) Eine lineare Funktion der in Schritt d) ermittelten Zykluszahl in Abhängigkeit von einem Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure, erstellt wird, und
 - 35 f) Die Amplifikationseffizienz E berechnet wird nach

$$E = G^{-1/a}$$

wobei a ermittelt wird als erste Ableitung der in Schritt e) ermittelten Funktion ist
5 und G die Grundzahl des Logarithmus ist

Beide bevorzugten Verfahrensweisen haben den Vorteil, dass kein systematischer Fehler dadurch
auftreten kann, dass eine die Bestimmung der Amplifikationseffizienz in einer Phase der PCR-
Reaktion erfolgt, bei der keine exponentielle Vermehrung der Target-Nukleinsäure mehr statt-
10 findet (Plateau-Phase).

Allerdings hat sich unerwartet herausgestellt, dass bei unter bestimmten Umständen die Ampli-
fikationseffizienz auch von der ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure abhängig sein
kann oder sich während der ersten Zyklen einer noch in der exponentiellen Phase befindlichen
15 Amplifikationsreaktion ändert. Gegenstand der Erfindung sind somit auch Verfahren zur Effzi-
enz-korrigierten Quantifizierung von Nukleinsäuren, bei denen die Effizienz der Amplifikation
dadurch bestimmt wird, dass

- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
- 20 b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedin-
gungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nu-
kleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- d) für jede Verdünnung die Zykluszahl C_p bestimmt wird, bei der der Signalschwel-
lenwert überschritten wird, und
- 25 e) die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der Menge an Target-
Nukleinsäure bestimmt wird.

Dies kann vorzugsweise durch Ableitung einer stetig differenzierbaren Funktion $F(C_p)$ der C_p -
Werte in Abhängigkeit von der ursprünglich eingesetzten Kopienzahl oder umgekehrt erfolgen.

30 Beispielsweise kann die Funktion $F(C_p) = \log$ (Konzentration der ursprünglich eingesetzten Ko-
pienzahl) durch mathematische Algorithmen wie einen polynomischen Fit höherer Ordnung
normalisiert werden. Die Amplifikationseffizienz E kann dann bestimmt werden nach der Glei-
chung

$$E = G^{-dF(C_p)/dC_p}$$

wobei $dF/(C_p)$ die Ableitung der stetigen Funktion und G die Grundzahl des Logarithmus ist.

- 5 Ein polynomischer Fit 4. Ordnung hat sich im Rahmen der Erfindung als besonders geeignet herausgestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren der Effizienz-korrigierten Quantifizierung von Nukleinsäuren kann prinzipiell sowohl für Verfahren der absoluten Quantifizierung als auch für Verfahren der
10 relativen Quantifizierung eingesetzt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung im Zusammenhang mit relativer Quantifizierung ist deshalb zunächst auch ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:

- 15 a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- 20 c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur des aus Schritt c) abgeleiteten Verhältnisses mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

25 Ein derartiges erfindungsgemäßes Verfahren eliminiert einerseits den Einfluß von in der untersuchten Probe möglicherweise enthaltenen Inhibitoren und korrigiert andererseits Fehler, die aufgrund der unterschiedlichen Amplifikationseffizienz von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure auftreten können.

30 Vorteilhafterweise werden die Schritte b) bis d) in einem parallelen Ansatz mit einer sogenannten Kalibratorprobe durchgeführt. Bei der Kalibratorprobe handelt es sich um eine Probe, bei der Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in einem bestimmten, für jede Messung konstantem Verhältnis zueinander vorliegen. Anschließend wird das Verhältnis der für die Probe
35 und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten als Maß für die ursprüngliche Menge an

Target-Nukleinsäure in der Probe bestimmt. Dies hat den Vorteil, dass zusätzlich weitere systematische Fehler eliminiert werden, die auf einer unterschiedlichen Detektionssensitivität von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure beruhen. Derartige systematische Fehler können beispielsweise auftreten durch unterschiedliche Hybridisationseigenschaften der Hybridisationssonden, oder – bei Fluoreszenzmarkierten Sonden – unterschiedliche Anregungseffizienz, Quantenausbeute, oder Kopplungseffizienz des Farbstoffes an die Sonde. Deshalb müssen die zu testende Probe und Kalibratorprobe für jedes Experiment mit den gleichen Detektionsmitteln, d.h. mit der gleichen Charge von Fluoreszenz-markierten Hybridisationssonden analysiert werden.

Eine besondere Ausführungsform der erfindungsgemäßen relativen Quantifizierung ist ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- f) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe gemäß der Formel

$$N(T)_0 / N(R)_0 = E(R)^{n(R)} / E(T)^{n(T)}, \text{ wobei}$$

- $N(T)_0$ = die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an Target-DNA
 $N(R)_0$ = die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an Referenz-DNA
 $E(R)$ = die Amplifikationseffizienz der Referenz-Nukleinsäure
 $n(R)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl der Referenz-Nukleinsäure
 $E(T)$ = die Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure
 $n(T)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl der Target-Nukleinsäure ist

Vorteilhafterweise werden zur Eliminierung systematischer Fehler aufgrund der Detektion der Amplifikationsprodukte bei dieser Ausführungsform zusätzlich die Schritte b), c) e) und f) mit einer Kalibrator-Probe durchgeführt und anschließend das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe bestimmt.

Die Berechnung des ermittelten Verhältnisses in Schritt f) ergibt sich erfindungsgemäß wie folgt:

$$N(T)_n = N(T)_0 \times E(T)^{n(T)} \quad (1)$$

$$N(R)_n = N(R)_0 \times E(R)^{n(R)} \quad (2)$$

wobei $N(T)_n$ = Menge an Target-DNA am Signalschwellenwert
und $N(R)_n$ = Menge an Referenz-DNA am Signalschwellenwert

Aus (1) und (2) folgt:

$$\frac{N(T)_n}{N(R)_n} = \frac{N(T)_0 \times E(T)^{n(T)}}{N(R)_0 \times E(R)^{n(R)}} \quad (3)$$

Daraus folgt:

$$\frac{N(T)_0}{N(R)_0} = \frac{N(T)_n \times E(R)^{n(R)}}{N(R)_n \times E(T)^{n(T)}} \quad (4)$$

Aufgrund der Tatsache, dass ein identischer Signalschwellenwert für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure festgelegt wird, ist approximativ davon auszugehen, dass

$$N(T)_n = N(R)_n \text{ ist.}$$

Unter dieser Voraussetzung ergibt sich dann ausgehend von Gleichung (4) für das ursprüngliche Verhältnis von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure die Gleichung

$$N(T)_0 / N(R)_0 = E(R)^{n(R)} / E(T)^{n(T)} \quad (5)$$

5

Die approximative Annahme gilt jedoch dann nicht, wenn die Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure mit unterschiedlichen Sensitivitäten detektiert werden. Erfindungsgemäß ist es deshalb besonders vorteilhaft, in einem Paralellansatz eine Kalibratorprobe zu vermessen und als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten $N(T)_0 / N(R)_0$ zu bestimmen.

10

Dabei ergibt sich aus Gleichung (4) unter Verwendung der Indices

A für zu analysierende Probe, und

K für Kalibratorprobe:

$$\frac{N(T)_{0A}}{N(R)_{0A}} \bigg/ \frac{N(T)_{0K}}{N(R)_{0K}} = \frac{\frac{N(T)_{nA} \times E(R)^{nA(K)}}{N(R)_{nA} \times E(T)^{nA(T)}}}{\frac{N(T)_{nK} \times E(R)^{nK(R)}}{N(R)_{nK} \times E(T)^{nK(T)}}} \quad (6)$$

15

Aufgrund der Tatsache, dass für die zu analysierende Probe und für die Kalibratorprobe ein identischer Signalschwellenwert festgesetzt ist und durch die Verwendung identischer Mittel zur Detektion von Target- und Referenz-Amplicons in der Probe und in der Kalibratorprobe ergibt sich für das Verhältnis des für die Probe und für die Kalibratorprobe ermittelten Quotienten:



$$\frac{N(T)_{nA}}{N(R)_{nA}} \bigg/ \frac{N(T)_{nK}}{N(R)_{nK}} = 1$$

20

Daraus ergibt sich für das Verhältnis der Quotienten aus zu analysierender Probe und Kalibratorprobe:

$$\frac{N(T)_{0A}}{N(R)_{0A}} \bigg/ \frac{N(T)_{0K}}{N(R)_{0K}} = E(R)^{nA(R) - nK(R)} \star E(T)^{nK(T) - nA(T)} \quad (7)$$

Folglich kann auf diese Weise ein relativer Wert für die ursprüngliche Kopienzahl an Target-Nukleinsäure in der Probe erhalten werden, bei dem sowohl systematische Fehler aufgrund von verschiedenen Amplifikationseffizienzen als auch aufgrund von unterschiedlich Detektionssensitivitäten eliminiert worden sind. Einzige Voraussetzung für die Richtigkeit des ermittelten

- 5 Wertes ist die begründete Annahme, dass bei absolut identischen Pufferbedingungen die Amplifikations- und Detektionseffizienzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen ebenfalls identisch sind.

Eine Voraussetzung allen erfindungsgemäßen Verfahren zur relativen Quantifizierung ist, dass sowohl die Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure als auch die Amplifikationseffizienz
10 der Referenz-Nukleinsäure bestimmt werden. Diese Bestimmungen erfolgen beide bevorzugt nach dem oben beschriebenen Verfahren durch Bestimmung einer Zykluszahl, bei der ein bestimmter Signalschwellenwert überschritten wird.



In einer bevorzugten Ausführungsform der relativen Quantifizierung wird die Probe in zwei Ali-
15 quots aufgeteilt und die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure erfolgt in getrennten Reaktionsgefäßen. Dadurch wird verhindert, dass sich die Amplifikationsreaktionen von Target-Nukleinsäure und Referenznukleinsäure hinsichtlich ihrer Effizienz beispielsweise durch Competition um Deoxynucleotide oder Taq-Polymerase gegenseitig beeinflussen. Darüber hinaus können Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
20 mit den gleichen Detektionssystemen, beispielsweise mit dem gleichen DNA-Bindefarbstoff nachgewiesen werden.

Alternativ kann die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure aus einer Probe im gleichen Reaktionsgefäß mit unterschiedlich markierten Hybri-
25 disationssonden erfolgen. Dies ist insbesondere bei nur geringen Mengen an zur Verfügung stehendem Probenmaterial von Vorteil, weil auf diese Weise wird die Anzahl der erforderlichen PCR-Reaktionen halbiert wird.

Soll die absolute Menge an nachzuweisender Target-Nukleinsäure in einer Probe bestimmt wer-
30 den, so besteht das Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe erfindungsgemäß aus folgenden Schritten

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen

- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- 5 d) Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten Kopienzahl mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

Vorteilhafterweise sind die Sequenzen von Target-Nukleinsäure und Standard weitgehend identisch. Bei der Auswahl der Sequenz für einen internen Standards muß jedoch berücksichtigt werden, dass Standard und Target-Nukleinsäure mit Hilfe des zur Verfügung stehenden Detektionssystems voneinander unterschieden werden können. Dies kann beispielsweise mit unterschiedlich markierten Hybridisationssonden für den Nachweis von Target-Nukleinsäure und internem Standard erfolgen. Idealerweise werden dabei Oligonukleotide als Detektionssonden verwendet, mit deren Hilfe minimale Sequenzunterschiede wie Punktmutationen voneinander unterschieden werden können.

Die Verwendung eines internen Standards hat dabei den Vorteil, dass in der Probe befindliche Inhibitoren ebenfalls die Amplifikation des Standards beeinflussen. Deshalb können Amplifikationseffizienz-Unterschiede minimiert werden.

Die Verwendung eines externen Standards hat dagegen den Vorteil, dass sich die Amplifikationsreaktionen von Target-Nukleinsäure und Standard nicht gegenseitig in kompetitiver Weise hinsichtlich ihrer Effizienz beeinflussen können. Darüber hinaus können die Amplifikationsprodukte von Standard und Target-Nukleinsäure in Parallelansätzen mit Hilfe des gleichen Detektionssystems, beispielsweise mit der gleichen Hybridisationssonde nachgewiesen werden. Nachteil sind hier mögliche unterschiedliche PCR-Effizienzen, bedingt durch Inhibitoren in der Probe. Dadurch bedingte Fehler in der Quantifizierung können durch das im Folgenden beschriebene Verfahren eliminiert werden:

In einer bevorzugten Ausführungsform zur absoluten Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen

- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- f) Bestimmung der ursprüngliche Kopienzahl $N(T)_0$ der Target-Nukleinsäure in der Probe nach der Formel

$$N(T)_0 = N(S)_0 * E(S)^{n(S)} / E(T)^{n(T)} \quad (8) \text{ wobei}$$

$N(S)_0$ = die ursprüngliche Menge eingesetztem Standard

$E(S)$ = die Amplifikationseffizienz des Standards

$n(S)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl des Standards

$E(T)$ = die Amplifikationseffizienz des Standards

$n(T)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl der Target-Nukleinsäure ist

Analog zur relativen Quantifizierung erfolgt dabei die Bestimmung der Amplifikationseffizienzen von Target-Nukleinsäure und internem Standard bevorzugt wie beschrieben durch Bestimmung einer Zykluszahl, bei der ein bestimmter Signalschwellenwert überschritten wird.

Die Berechnung von $N(T)_0$ ergibt sich erfindungsgemäß wie folgt:

$$N(T)_n = N(T)_0 * E(T)^{n(T)}$$

und

$$N(S)_n = N(S)_0 * E(S)^{n(S)}$$

Aufgrund der Tatsache, dass ein identischer Signalschwellenwert für Target- und Standard-Nukleinsäure festgelegt wird, ergibt sich approximativ:

$$N(T)_n = N(S)_n,$$

Somit berechnet sich die ursprünglich in der Probe vorliegende Kopienzahl der Target-Nukleinsäure nach der Gleichung

$$N(T)_0 = N(S)_0 \cdot E(S)^{n(S)} / E(T)^{n(T)} \quad (8)$$

- 5 Gegenstand der Erfindung sind insbesondere solche Ausführungsformen der beschriebenen Verfahren zur Effizienz-korrigierten Quantifizierung von Nukleinsäuren, bei denen die Amplifikationsprodukte durch Hybridisationssonden detektiert werden, die auf viele unterschiedliche Arten mit einer detektierbaren Komponente markiert sein können.

- 10 Voraussetzung sowohl für die Effizienz-korrigierte Bestimmung der ursprünglichen Menge einer Target-Nukleinsäure als auch für die Bestimmung der Amplifikationseffizienzen an sich ist die Festlegung von Signalschwellenwerten sowie die anschließende Bestimmung einer Zykluszahl der jeweiligen Amplifikationsreaktion, bei der ein bestimmter Signalschwellenwert erreicht wird. Die Festlegung des Signalschwellenwertes kann dabei gemäß dem Stand der Technik auf verschiedene Arten erfolgen:

15

Gemäß dem Stand der Technik kann der Signalschwellenwert beispielsweise ein Signal sein, welches einem bestimmten Vielfachen der statistischen Varianz des Backgroundsignals entspricht (ABI Prism 7700 Application manual, Perkin Elmer).

20

Alternativ kann die Bestimmung der Zykluszahl, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird nach der sogenannten „Fit Point above Threshold“ Methode erfolgen (LightCycler Operator's Manual, B59-B68, Roche Molecular Biochemicals, 1999).

30

In einer weiteren Ausführungsform kann der Schwellenwert nicht als absoluter Wert, sondern als relativer Wert definiert werden, wenn unabhängig vom absoluten Signalwert der Verlauf der Amplifikationsreaktion in Abhängigkeit von der Zykluszahl bestimmt wird und anschließend eine n-te Ableitung berechnet wird. Wobei In diesem Fall kann das Überschreiten bestimmter Extrema als Überschreiten eines bestimmten Signalsschwellenwertes definiert werden. (EP-Anmelde-Nr. 00106523.4). Diese Art der Schwellenwertfestlegung ist also unabhängig von der absoluten Signalstärke beispielsweise eines Fluoreszenzsignals. Deshalb ist sie besonders geeignet diejenigen Ausführungsformen, bei denen Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure im selben Reaktionsgefäß amplifiziert werden und mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzmarkierungen detektiert werden. Als besonders geeignet haben sich im Zusammenhang mit der Effizienz-korrigierten Quantifizierung von PCR-Produkten Verfahren erwiesen, bei denen das Maximum der 2. Ableitung als Maß für den Signalschwellenwert bestimmt wird.

35

Bei den für die erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzenden Hybridisationssonden handelt es sich in der Regel um einzelsträngige Nukleinsäuren wie einzelsträngige DNA oder RNA bzw. deren Derivate oder alternativ auch PNAs, die bei der Annealing Temperatur der Amplifikationsreaktion mit der Target-Nukleinsäure hybridisieren. Üblicherweise haben diese Oligonukleotide eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden.

Die Markierung kann abhängig vom genauen Detektionsformat an jeder beliebigen Ribose- oder Phosphatgruppe des Oligonukleotids eingeführt werden. Bevorzugt sind Markierungen am 5' und 3' Ende des Nukleinsäuremoleküls.

Die Art der Markierung muß im Echtzeit-Modus der Amplifikationsreaktion detektierbar sein. Dies ist beispielsweise prinzipiell auch (aber nicht nur) möglich mithilfe von Markierungen, die nach dem Prinzip der NMR detektierbar sind.

Besonders bevorzugt sind Verfahren, bei denen die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe von mindestens einer Fluoreszenz-markierten Hybridisationssonde erfolgt.

Dabei sind viele verschiedene Testführungen möglich. Als besonders geeignet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben sich die folgenden drei Formate erwiesen:

a) FRET-Hybridisationssonden

Für dieses Testformat werden 2 einzelsträngige Hybridisationssonden gleichzeitig verwendet, die komplementär zu benachbarten Stellen desselben Strangs der amplifizierten Target-Nukleinsäure sind. Beide Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzkomponenten markiert. Bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge einer ersten Komponente überträgt diese nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, sodass bei Bindung beider Hybridisationsproben an benachbarte Positionen des nachzuweisenden Target-Moleküls eine Fluoreszenzemissionmission der zweiten Komponente gemessen werden kann.

Alternativ können ein Fluoreszenz-markierter Primer und nur eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet werden (Bernard et al., Analytical Biochemistry 235, p. 1001-107 (1998)).

b) TaqMan-Hybridisationssonden

Eine einzelsträngige Hybridisationssonde wird mit 2 Komponenten markiert. Bei Anregung der ersten Komponente mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, den sogenannten Quencher übertragen. Während des Annealing Schrittes der PCR Reaktion bindet die
5 Hybridisationssonde an die Target-DNA und wird während der sich anschließenden Elongationsphase durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch werden die angeregte Fluoreszenzkomponente und der Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass eine Fluoreszenzemission der ersten Komponente in gemessen werden kann.

10 c) Molecular Beacons

Diese Hybridisationssonden sind ebenfalls mit einem einer ersten Komponente und einem Quencher markiert, wobei sich die Markierungen vorzugsweise an den beiden Enden der Sonde befinden. In Lösung befinden sich beide Komponenten aufgrund der Sekundärstruktur der Sonde in räumlicher Nähe zueinander. Nach Hybridisierung an die Target-Nukleinsäure werden
15 beide Komponenten von einander getrennt, sodass nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge die Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann (Lizardi et al., US 5,118,801).

In den beschriebenen Ausführungsformen, bei denen in jeweils einem Reaktionsgefäß entweder
20 nur die Target-Nukleinsäure oder nur die Referenz-Nukleinsäure oder ein externer Standard amplifiziert wird, kann das jeweilige Amplifikationsprodukt erfindungsgemäß auch durch einen DNA-Bindefarbstoff nachgewiesen werden, welcher bei Interaktion mit doppelsträngiger Nukleinsäure nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge ein entsprechendes Fluoreszenzsignal emittiert. Als besonders geeignet für diese Anwendung haben sich die Farbstoffe
25 SybrGreen und SybrGold (Molecular Probes) erwiesen. Alternativ können auch interkalierende Farbstoffe verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem auch Kits, die entsprechende Mittel zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren enthalten. Erfindungsgemäß können diese Mittel in unterschiedlichster Zusammensetzung in den Kits vorhanden sein. Ein Kit enthält vorzugsweise
30 Reagenzien wie beispielsweise eine Reverse Transkriptase zur Herstellung einer cDNA, DNA-Polymerase für die Amplifikationsreaktion, spezifische Primer für die Amplifikationsreaktion und gegebenenfalls auch spezifische Hybridisationssonden zur Detektion des Amplifikationsproduktes. Alternativ können Polymerasen für eine Einschnitt-RT-PCR Reaktion im Kit
35 enthalten sein. Ebenfalls kann ein erfindungsgemäßer Kit Beipackzettel oder Disketten mit Da-

teilen mit für definierte Amplifikationsbedingungen im voraus bestimmten Amplifikationseffizienzen enthalten. Bestandteil der Erfindung ist schließlich auch ein Kit, welcher zusätzlich noch Reagenzien zur Synthese und Markierung von Oligonukleotiden wie Fluoreszenz-NHS-Ester oder Fluoreszenzmarkierte CPGs enthält. Darüber hinaus enthält ein erfindungsgemäßer Kit
5 gegebenenfalls auch eine DNA, die als interner oder externer Standard eingesetzt werden kann,

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1: Amplifikation von Cytokeratin 20 (CK20) und Porphobilinogen (PBGD) cDNA's.

10 RNA aus der Zelllinie HT-29 (ATCC) wurde mit Hilfe eines HighPure-RNA-Restriction-Kits (Roche Diagnostics GmbH) isoliert. Nach Semi-quantitativer Spektrophotometrischer Bestimmung wurde die Konzentration RNA auf 100 ng/ μ l in RNA-freiem Wasser eingestellt. Daraus wurden drei serielle Einfachverdünnungen mit RNA Konzentrationen von 10 ng, 1 ng und 100
15 pg/ μ l hergestellt.

Aus diesen Verdünnungen wurde Gesamt-cDNA durch Reverse Transkription unter folgenden Bedingungen hergestellt:

20	1 x	AMV Reverse Transcription Puffer
	je 1	mM Deoxynucleosid-Triphosphate
	0,0625	mM randomisierte Hexamere
	10 u	AMV Reverse Transcriptase
	10 μ l	RNA
25	Ad 20 μ l	Wasser

Für die cDNA-Synthese wurden sämtliche Ansätze für 10 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt. Als Kalibrator wurde eine Probe enthaltend 10 ng/ μ l HT29 RNA verwendet.

30 Anschließend erfolgte die Amplifikationsreaktion und deren Echtzeitmessung im FRET-Hybprobe Format auf einem LightCycler Instrument (Roche Diagnostics GmbH). Dabei wurde jeder Ansatz unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

1 x Fast Start DNA Hybridisation Probes Puffer

1 x Detection Mix

2 µl cDNA

Ad 20 µl Wasser

5

Der 1 x Detection Mix bestand aus je 0,5 µmM Forward and Reverse Primern, je 0,2 µmM Fluorescein and LC-Red 640 markierten Hybridisationssonden 4 mM Magnesiumchlorid und 0,005 % Brj-35.

- 10 Für die Amplifikation einer CK20 Sequenz wurden Primer mit SEQ:ID:No: 1 and SEQ:ID:No: 2 verwendet. Zur Detektion des CK20 Produktes wurden eine Fluorescein Probe der SEQ:ID:No: 3 und eine LC-Red 640 Hybridisationsprobe der SEQ:ID:No: 4 verwendet. Zur Detektion der PBGD Sequenz wurden Primer der SEQ:ID:No: 5 und 6 verwendet. Für die Detektion von PBGD wurden eine Fluorescein markierte Hybridisationprobe der SEQ:ID:No: 7, sowie eine LC-Red 640 markierte Hybridisationsprobe gemäß SEQ:ID:No: 8 eingesetzt.
- 15

Zur Amplifikation wurden die Ansätze im Gegenwert von 5mM Magnesiumchlorid zunächst für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Die eigentliche Amplifikationsreaktion wurde für 50 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

20

10 Sek. 95°C

10 Sek. 60°C

5 Sek. 72°C

- 25 Nach jeder Inkubation bei 60°C erfolgte eine Fluoreszenzmessung entsprechend den Angaben des Herstellers. Der Signalschwellenwert (Cp-Wert) wurde als Maximum der 2. Ableitung der Amplifikationsreaktion in Abhängigkeit von der Zykluszahl bestimmt.

Beispiel 2: Bestimmung der Effizienz der Amplifikation von CK20 und PBGD

30

Zur Bestimmung der Effizienz wurde eine Funktion erstellt, in der die für die jeweilige Konzentration ermittelte Zykluszahl Cp in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der eingesetzten RNA-Konzentration bestimmt wurde.

Aus der erhaltenen Funktion wurde durch Regressionsanalyse mit Hilfe der LightCycler Software eine lineare Funktion errechnet. Ausgehend von dieser Funktion wurde die Effizienz nach der Gleichung

5 Effizienz = $10^{-1/a}$ bestimmt,

wobei ^a die Steigung (1. Ableitung) der ermittelten Regressionsgerade ist.

Tabelle 2:

Conc (ng)	Log (ng)	Cp-CK20	Cp-PBGD
0.1	-1.0	35.73	38.73
1	0.0	30.13	33.59
10	1.0	24.20	28.63
Effizienz:		1.491	1.578

10 Cp: gemessene Zykluszahl

Die für CK20 und PBGD erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass einerseits die Effizienzen deutlich verschieden von 2,00 sind, also nicht bei jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der Target-Nukleinsäure erfolgt. Andererseits zeigt das Ergebnis, dass
15 die Effizienzen der Amplifikation von CK20 und PBGD selbst unter ansonsten identischen Bedingungen deutlich von einander verschieden sind.

Beispiel 3: Bestimmung des ursprünglichen Verhältnisses von Target- und Referenznukleinsäure mit und ohne Korrektur der Amplifikationseffizienz

20

Unter den in Beispiel 1 geschilderten Bedingungen sollte das bestimmte Verhältnis von ursprünglicher Menge an CK20 und PBGD unabhängig von der jeweils amplifizierten Konzentration des verwendeten Probenmaterials sein. Daher wurde die Bestimmung des Verhältnisses für verschiedene Konzentrationen an eingesetzter Proben RNA dazu benutzt, die Auswirkung einer
25 Effizienzkorrektur auf Grundlage der erhaltenen Messwerte zu überprüfen. Dabei wurde das Verhältnis von CK20 zu PBGD erfindungsgemäß nach Gleichung (5) ermittelt. Das Verhältnis wurde zum einen mit Hilfe der aus Beispiel 2 ermittelten Effizienzen und zum anderen mit einer sowohl für CK20, als auch für PGD angenommenen Amplifikationseffizienz von 2,00 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt:

Tabelle 3:

HT29 (ng)	CP CK20	Cp PBGD	$N(T)_0 / N(R)_0$ Effizienz=2	$N(T)_0 / N(R)_0$ Effizienz korrigiert
0.1ng	35.73	38.73	8.00	29.68
1ng	30.13	33.59	11.00	26.66
10ng	24.20	28.63	21.56	29.66
M:			13.52	28.66
SD:			7.12	1.74
%CV:			52.7%	6.1%

Cp= gemessene Zykluszahl

M= Mittelwert

SD= Standardabweichung

%CV= Variationskoeffizient

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigen die für unterschiedliche Mengen an Proben RNA berechneten Effizienz-korrigierten Werte des Verhältnisses $N(T)_0 / N(R)_0$ eine signifikant geringere Standardabweichung als die unkorrigierten Werte und einen Variationskoeffizienten von 6,1 % im Vergleich zu 52,7 %.

Beispiel 4: Effizienzkorrektur bei Verwendung eines Kalibrators

Analog zu Beispiel 1 und 2 wurden Amplifikationsreaktionen in Gegenwart von 10 mM Magnesiumchlorid durchgeführt. Dabei wurden für CK20 eine Effizienz von 1,491 und für PBGD eine Effizienz von 1,578 ermittelt. Zusätzlich wurden die Cp-Werte einer Kalibratorprobe mit unbekannter Menge an HT-29 RNA bei 5 mM bzw. 10 mM Magnesiumchlorid ermittelt. Ausgehend von den gemessenen Daten wurde der Quotient der Verhältnisse von CK20 zu PBGD zwischen der jeweiligen analysierten Probe und dem entsprechenden Kalibrator erfahrungsgemäß nach der Gleichung (7) bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte einerseits mit angenommener Effizienz für Amplifikation von CK20 und PBGD von 2 sowie andererseits mit Hilfe der experimentell erstellten Amplifikationseffizienzen. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4:

MgCl ₂	HT29 (ng)	Cp CK20	Cp PBGD	T:R/C Effizienz	T:R/C Effizienz korrigiert
5mM	0.1ng	36.59	39.09	0.76	0.92
5mM	1ng	30.60	32.60	0.54	0.72
5mM	10ng	25.19	27.95	0.91	0.95
Kalibrator	Cal.	24.78	27.67	1.00	1.00
10mM	0.1ng	35.73	38.73	0.39	1.04
10mM	1ng	30.13	33.59	0.53	0.93
10mM	10ng	24.20	28.63	1.04	1.04
Kalibrator	Cal.	24.01	28.38	1.00	1.00
M:				0.70	0.93
SD:				0.26	0.10
%CV:				36.7%	11.1%

$$T:R/C = \frac{N(T)_{0A}}{N(R)_{0A}} \bigg/ \frac{N(T)_{0K}}{N(R)_{0K}}$$

Cp = gemessene Zykluszahl

M = Mittelwert

SD = Standardabweichung

%CV = Variationskoeffizient

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, besitzen die Effizienz korrigierten Werte eine geringere Standardabweichung (0,10) sowie einen dreifach geringeren Variationskoeffizienten als die T:R/C-Werte bei einer angenommenen PCR-Effizienz von 2,00. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine erfundungs-
gemäße Effizienzkorrektur auch bei Quantifizierungen von Vorteil ist, in denen bereits eine
Normalisierung mit Hilfe von Kalibratoren durchgeführt wird.

Beispiel 5: Absolute Quantifizierung von Plasmid-DNA

Zu diesem Zweck wurde eine dekadische Verdünnungsreihe eines Plasmids enthaltend das PSA-Gen von 10⁹ bis 10² Kopien erstellt. Gleichzeitig wurde eine zweite dekadische Verdünnungsreihe mit einem Plasmid enthaltend das Gen für TNF (Tumor Necrosis Faktor) mit unbekannten Kopienzahlen an Plasmid-DNA erstellt. Dann wurden die PSA-Ansätze mithilfe von Primern gemäß SEQ ID NO: 9 und 10 sowie die TNF-Ansätze mithilfe der Primer SEQ ID NO: 11 und 12 auf dem LightCycler (Roche Diagnostics) unter Standardbedingungen amplifiziert (Roche Diagnostics LightCycler SybrGreen Mastermix, 5 mM Endkonzentration MgCl₂, 0,5µM Endkonzentration je Primer). Die Amplifikationsmessung in Echtzeit erfolgte mithilfe des DNA-

Bindefarbstoffs SybrGreenI (Molecular Probes) unter Standardbedingungen, wobei die Auswertung gemäß den Angaben des Herstellers im „Second Derivative“ Modus durchgeführt wurde.

- 5 Auf Grundlage der erhaltenen Daten wurde die ursprüngliche Kopienzahl des TNF-Plasmids auf zwei verschiedene Arten bestimmt.

Einerseits wurde eine Eichgerade auf Grundlage der PSA Amplifikation unter der Annahme gleicher Amplifikationseffizienz von PSA und TNF erstellt.

10

Andererseits wurde die ursprüngliche Kopienzahl erfindungsgemäß nach Formel (8) bestimmt.

Analog zu Beispiel 2 wurde Amplifikationseffizienz für PSA und TNF durch Ermittlung einer Regressionsgerade nach der Formel

15

$$E = 10^{-1/a} \text{ bestimmt,}$$

wobei ^a die Steigung (1. Ableitung) der ermittelten Regressionsgerade ist. Dabei wurde für PSA eine Amplifikationseffizienz von 2,03 und für TNF eine Amplifikationseffizienz von 2,13 ermittelt.

20

Die Ergebnisse der beiden verschiedenen Quantifizierungsverfahren sind in Tabelle 5 dargestellt. Als Maß für die Genauigkeit der Bestimmung wurde ein sogenannter Verdünnungsscheck durchgeführt. Dabei errechnen sich die als Verdünnungsscheck bezeichneten Werte aus dem Quotienten der für die jeweilige Verdünnung ermittelten Kopienzahlen von zwei sich jeweils um eine Zehnerpotenz voneinander unterscheidenden Verdünnungsansätzen. Somit wäre idealerweise ein Wert jeweils 10,00 zu erwarten.

25

Tabelle 5

Verdün- nung	<i>Nicht Effizienz korrigiert</i>		<i>Effizienz korrigiert</i>	
	Bestimmte Kopienzahl je verdünnung	Verdünnungs- check	Bestimmte Kopienzahl je Verdünnung	Verdünnungs- check
1	30826128	10,10	27728632	12,12
10^{-1}	3053000	13,82	2287050	14,98
10^{-2}	220900	7,19	152643	7,94
10^{-3}	30710	11,61	19227	13,89
10^{-4}	2646	8,55	1384	9,52
10^{-5}	309,5	7,61	145,4	8,76
10^{-6}	40,66	3,86	16,6	3,84
10^{-7}	10,54		4,3	
Mittelwert:		8,96		10,16

- Wie das Ergebnis des Verdünnungschecks aus Tabelle 5 zeigt, ergibt als Mittelwert für Effizienz-
- 5 korrigierte Daten ein Wert von 10,16, wohingegen sich als Mittelwert von nicht Effizienz-
- korrigierten Daten ein Wert von 8,96 ergibt, welcher signifikant weiter entfernt vom Idealwert
- 10,00 ist. Daraus folgt, daß eine Effizienzkorrektur auch für Ausführungsformen von Vorteil ist,
- bei denen es sich um eine absolute Quantifizierung von Nukleinsäuren mithilfe von PCR han-
- delt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

5 <120> Verfahren zur Effizienz-korrigierten Echt-Zeit PCR
Quantifizierung

<130> 539400DE

10 <140>
<141>

<160> 12

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

atcaagcagt ggtacgaaac

20

25

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 2

aggacacacc gagcattt

18

35

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 3

attacagaca aattgaagag ctgcg

25

45

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

50

<400> 4

agtcagatta aggatgctca actgc

25

55

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

60

<400> 5

gcggagccat gtctggtaa

19

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
5
<400> 6
ccagggtacg aggctttcaa 20

10 <210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

15 <400> 7
gagagtgatt cgcgtgggta cccg 24

20 <210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

25 <400> 8
agagccagct tgctcgcata cagac 25

30 <210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens

35 <400> 9
gaggagttct tgaccccaaa ga 22

40 <210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

45 <400> 10
tccagcgtcc agcacaca 18

50 <210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

50 <400> 11
cctgccccaa tccctttatt 20

55 <210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

60 <400> 12
ggtttcgaag tggtggtctt g 21

Ansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation in Echtzeit
- d) Quantifizierung der ursprünglichen Menge der Target-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten ursprünglichen Menge mit Hilfe der bestimmten Amplifikationseffizienz

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Effizienz der Amplifikation dadurch bestimmt wird, dass

- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
- b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
- e) eine logarithmisch lineare Funktion der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure in Abhängigkeit von der Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert überschritten wird, erstellt wird, und
- f) die Amplifikationseffizienz E berechnet wird nach

$$E = G^{-a}$$

wobei a ermittelt wird als erste Ableitung der in Schritt e) ermittelten Funktion und G die Grundzahl des Logarithmus ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Effizienz der Amplifikation dadurch bestimmt wird, dass

- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
- b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
- e) eine lineare Funktion der in Schritt d) ermittelten Zykluszahl in Abhängigkeit von einem Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure, erstellt wird, und
- f) die Amplifikationseffizienz E berechnet wird nach

$$E = G^{-1/a}$$

wobei a ermittelt wird als erste Ableitung der in Schritt e) ermittelten Funktion ist und G die Grundzahl des Logarithmus ist

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Effizienz der Amplifikation dadurch bestimmt wird, dass

- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
- b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
- e) die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der Menge an Target-Nukleinsäure bestimmt wird.

5. Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
 - 5 b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
 - c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
 - 10 d) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur des aus Schritt c) abgeleiteten Verhältnisses mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass
- 15 zusätzlich die Schritte b) – d) mit einer Kalibrator-Probe durchgeführt werden, und dass anschließend das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe bestimmt wird
- 20 7. Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
 - 25 b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
 - c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
 - d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
 - 30 e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird

- f) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe gemäß der Formel

$$N(T)_0 / N(R)_0 = E(R)^{n(R)} / E(T)^{n(T)}, \text{ wobei}$$

5

$N(T)_0$ = die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an Target-DNA

$N(R)_0$ = die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an Referenz-DNA

$E(R)$ = die Amplifikationseffizienz der Referenz-Nukleinsäure

$n(R)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl der Referenz-Nukleinsäure

10

$E(T)$ = die Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure

$n(T)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl der Target-Nukleinsäure ist



8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich die Schritte b), c) e) und f) mit einer Kalibrator-Probe durchgeführt

15

werden, und dass

anschließend das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe bestimmt wird

20

9. Verfahren nach Anspruch 5-8, dadurch gekennzeichnet, dass sowohl die Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure als auch die Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Referenz-Nukleinsäure nach einem Verfahren gemäß Anspruch 2-4 erfolgt



10. Verfahren nach Anspruch 5-9, dadurch gekennzeichnet, dass die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure aus einer Probe in getrennten Reaktionsgefäßen erfolgt

30

11. Verfahren nach Anspruch 5-9, dadurch gekennzeichnet, dass die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure aus einer Probe im gleichen Reaktionsgefäß mit unterschiedlich markierten Hybridisationssonden erfolgt

12. Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten Kopienzahl mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

13. Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- f) Bestimmung der ursprünglichen Kopienzahl $N(T)_0$ der Target-Nukleinsäure in der Probe nach der Formel

$$N(T)_0 = N(S)_0 \cdot E(S)^{n(S)} / E(T)^{n(T)}, \text{ wobei}$$

$N(S)_0$ = die ursprüngliche an Menge eingesetzte Standard

$E(S)$ = die Amplifikationseffizienz des Standards

$n(S)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl des Standards

$E(T)$ = die Amplifikationseffizienz des Standards

$n(T)$ = die in Schritt e) gemessene Zykluszahl der Target-Nukleinsäure ist

14. Verfahren nach Anspruch 12-13, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Amplifikationseffizienzen gemäß Anspruch 2-4 erfolgt
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 12-14 mit einem internen Standard, wobei die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und internem Standard mit unterschiedlich markierten Hybridisationssonden erfolgt
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 1-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe von mindestens einer Fluoreszenz-markierten Hybridisationssonde erfolgt
- 15 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe von FRET-Hybridisationsproben, Molecular Beacons oder TaqMan Sonden erfolgt
18. Verfahren nach Anspruch 1-10 oder 12-14, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe eines DNA- bindenden Farbstoffs, vorzugsweise mit SybrGreen I erfolgt
- 20 19. Kit enthaltend Mittel zur Durchführung eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1-18

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte: (i) Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen (ii) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen (iii) Messung der Amplifikation in Echtzeit, (iv) Quantifizierung der ursprünglichen Menge der Target-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur der aus Schritt (iii) abgeleiteten ursprünglichen Menge mit Hilfe der bestimmten Amplifikationseffizienz. Die erfindungsgemäße Effizienzkorrektur von PCR Reaktionen zur Quantifizierung von Nukleinsäuren kann sowohl zur absoluten Quantifizierung mit Hilfe von externen oder internen Standards als auch zur relativen Quantifizierung im Vergleich zur Expression von Housekeeping Genen eingesetzt werden.